

Haemophilus paragallinarum: Etiología de la coriza infecciosa

Haemophilus paragallinarum: Etiology of infectious coryza

Edgardo Soriano Vargas*
Horacio Raúl Terzolo**

Abstract

The bacterium *Haemophilus paragallinarum* is the etiological agent of infectious coryza, an upper respiratory disease of poultry. The economic impact of the disease caused by this bacterium is considerable, particularly in multi-age farms. The bacteriologic characteristics of the etiological agent are described in a manner that allocates it within the Pasteurellaceae family, and also shows its relationship to other potentially pathogenic agents in poultry. Particular emphasis is made concerning the more recent knowledge regarding the antigenic structure and the serological classification of *H. paragallinarum*.

Key words: HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM, INFECTIOUS CORYZA, POULTRY DISEASES, CHICKENS.

Resumen

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de los pollos. Ésta tiene impacto considerable en la avicultura, principalmente en granjas con edades múltiples. En este trabajo, se revisan las características bacteriológicas que establecen esta bacteria en la familia Pasteurellaceae y relacionarla con otros agentes potencialmente patógenos para las aves. Se da énfasis al conocimiento más reciente en cuanto a la estructura antigénica y la clasificación serológica de *H. paragallinarum*.

Palabras clave: HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM, CORIZA INFECCIOSA, ENFERMEDADES DE LAS AVES, POLLOS.

Recibido para su publicación el 11 de diciembre de 2003 y aceptado el 3 de junio del 2004.

* Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Dirección actual: Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC 276, 7620, Balcarce, Argentina. E-mail: terzolo@balcarce.inta.gov.ar

Introduction

The bacterium *Haemophilus paragallinarum* is the causative agent of infectious coryza, an upper respiratory tract disease of chickens (*Gallus gallus*), which is characterized for producing nasal discharge, sneezing and facial swelling. The economic impact of the infection caused by this bacterium results in losses in poultry industry, due to growth retardation, weight loss, increased number of culls and tendency to acquire chronic, complicated respiratory disease. In laying flocks, egg production can be reduced up to 40%; more commonly happening at the onset of the disease when the birds have reached the egg production peak.¹ When coryza is present without any other associated disease, it is characterized as an acute disease with a short course (of approximately two weeks) and spontaneous recovery. However, the involvement of other bacterial or viral agents is common. In these cases, the duration of the disease is prolonged (up to seven weeks) and this clinical outcome is named "complicated infectious coryza".² Birds with complicated coryza do not easily cure and usually remain with different consequences, which leads to important culling rates. Similarly to other infectious agents, variant strains of *H. paragallinarum* and various types of infection caused by this bacteria exist.³ In some cases the available commercial vaccines did not completely prevent infections caused by these variant strains.^{4,5} In the present review there is information about the etiologic agent of this disease, with particular emphasis to current information.

History

In 1932 De Blicke⁶ proposed the name *Bacillus haemoglobinophilus coryza gallinarum* for the causative agent of the "contagious catarrh" of chickens. Based on bacteriologic studies and criteria of the binomial nomenclature system, independently in 1934, Eliot & Lewis⁷ and Delaplane *et al.*⁸ proposed the name *Haemophilus gallinarum* for the causative agent of infectious coryza. Several studies have shown the requirement of the growth factors, X (hemin) and V (NAD, nicotinamide adenine dinucleotide), for the *in vitro* cultivation of *H. gallinarum*.⁹⁻¹² However, McGaughey¹³ and Page¹⁴ reported a number of X-factor-independent isolates. Based on these studies, Biberstein and White¹⁵ proposed the species *H. paragallinarum* as the name of the causative microorganisms of infectious coryza, which was V-factor-dependent but X-factor-independent. Since then, the new isolates from infectious coryza outbreaks are classified as *H. paragallinarum*, with the exception of only one paper.¹⁶ Today it is accepted that *H. gallinarum* had never

Introducción

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*); se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El impacto económico de la infección por esta bacteria radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada. En gallinas de postura, la producción de huevo puede reducirse hasta 40%; lo más común es el desencadenamiento de la enfermedad cuando las aves alcanzan el pico de postura.¹ Cuando la coriza cursa sin otras enfermedades asociadas, se caracteriza por ser enfermedad aguda de curso corto (dos semanas) y curación espontánea. Sin embargo, es común la asociación con otros agentes bacterianos o virales. En estos casos, la duración del curso de la enfermedad se prolonga (siete semanas) y el cuadro se denomina coriza infecciosa complicada.² Las aves con cuadro complicado no se curan fácilmente y suelen quedar secuelas diversas, siendo común el descarte de un número importante de aves. Como ha sucedido con otros agentes infecciosos, se tiene evidencia de cepas variantes de *H. paragallinarum* y la infección que esta bacteria ocasiona.³ En algunos casos las bacterinas existentes no han prevenido la infección de estas cepas variantes.^{4,5} En el presente trabajo de actualización se revisa la información disponible sobre el agente etiológico de esta enfermedad, dando particular énfasis al conocimiento más reciente.

Historia

En 1932 De Blicke⁶ propuso el nombre *Bacillus haemoglobinophilus coryza gallinarum* para el agente causal del "catarro contagioso" de los pollos. Con base en estudios bacteriológicos y en los criterios del sistema de nomenclatura binomial, de manera independiente, en 1934, Eliot y Lewis⁷ y Delaplane *et al.*⁸ propusieron el nombre *Haemophilus gallinarum* para el agente causal de la coriza infecciosa. Varios estudios mostraron el requerimiento de los factores de crecimiento X (hemin) y V (NAD, dinucleótido de adenina nicotinamida) para el cultivo *in vitro* de *H. gallinarum*.⁹⁻¹² Sin embargo, McGaughey¹³ y Page¹⁴ señalaron la independencia del factor X de crecimiento en un número de aislamientos estudiados. Basados en estos estudios, Biberstein y White¹⁵ propusieron la especie *H. paragallinarum* para los microorganismos causantes de coriza infecciosa, dependientes del factor V pero independientes del factor X de crecimiento.

existed and that the confusion was related to an incorrect description of the studied isolates at that time due to limitations of the old available laboratory techniques.^{17,18}

Incidence and distribution

The presence of *H. paragallinarum*, or infectious coryza, have been reported in Argentina,¹⁹ Australia,²⁰ Bulgaria,²¹ Canada,²² Egypt,²³ Great Britain,²⁴ Guatemala,²⁵ Holland,⁶ India,²⁶ Indonesia,²⁷ Iraq²⁸ and Swiss,²⁹ among other countries. These reports indicate a worldwide distribution of *H. paragallinarum*, mainly in countries with an intensive poultry industry.

In the United States of America outbreaks of infectious coryza have been reported in California,³⁰⁻³³ Alabama³⁴ and Oregon.³⁵ In Mexico, there were reports in the States of Sonora,³⁶ Jalisco, Mexico, Michoacan, Morelos, Puebla and Yucatan.³⁷

Infectious coryza is a cosmopolitan disease, which is present everywhere chickens are raised. However, it is considered as an exotic disease in New Zealand, which is the only country that appears to be free from *H. paragallinarum*. It is important to highlight that this country is also free of avian typhoid (*Salmonella gallinarum*), ornithobacteriosis (*Ornithobacterium rhinotracheale*) and turkey coryza (*Bordetella avium*).³⁸

Etiology

Classification

The bacterium *H. paragallinarum* is a member of the Pasteurellaceae family.³⁹ Even that it is now recognized as a X-factor-independent bacterium, it is still considered as a member of the *Haemophilus* genus.¹⁸ In addition, since 1992 there have been reports of *H. paragallinarum* V-factor-independent isolates, from chickens with infectious coryza in South Africa⁴⁰⁻⁴² and more recently in Mexico as well.⁴³ Identification of independent isolates of both X- and V-factors arise doubts on the current nomenclature of this microorganism. However, the current taxonomic classification is: superkingdom, Procaryotae; kingdom, Eubacteria; division, Gracilicutes; class, Protobacteria; family, Pasteurellaceae; genus, *Haemophilus* and species, *H. paragallinarum*.³⁹

Hollander and Mannheim,⁴⁴ by characterization of respiratory quinones, and Piechulla *et al.*,⁴⁵ by genetic and phenotypic characterization, suggested that *H. paragallinarum* should be regarded as a member of the genus *Actinobacillus*. Despite that conclusive studies have not been performed and now it is possible that this bacterium could be regarded as a member of

A partir de entonces, con excepción de un informe,¹⁶ los nuevos aislamientos en brotes de coriza infecciosa se clasifican como *H. paragallinarum*. Hoy se acepta que *H. gallinarum* nunca existió y que la confusión se debió a la descripción errónea de los aislamientos estudiados a causa de limitaciones en las técnicas de laboratorio empleadas.^{17,18}

Incidencia y distribución

Se ha informado la presencia de *H. paragallinarum*, o de la coriza infecciosa, en Argentina,¹⁹ Australia,²⁰ Bulgaria,²¹ Canadá,²² Egipto,²³ Gran Bretaña,²⁴ Guatemala,²⁵ Holanda,⁶ India,²⁶ Indonesia,²⁷ Iraq²⁸ y Suiza,²⁹ entre otros países. Estos informes indican distribución amplia de *H. paragallinarum* en el mundo, principalmente en países con industria avícola intensiva.

En Estados Unidos de América se han informado brotes de coriza infecciosa en California,³⁰⁻³³ Alabama³⁴ y Oregon.³⁵ En México, en Sonora,³⁶ Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla y Yucatán.³⁷

La coriza infecciosa es una enfermedad cosmopolita, existe en todas partes donde se crían gallinas. Sin embargo, se considera exótica en Nueva Zelanda, único país que parece estar libre de *H. paragallinarum*. Cabe resaltar que esa nación está, además, libre de tifoidea aviar (*Salmonella gallinarum*), ornitobacteriosis (*Ornithobacterium rhinotracheale*) y coriza de los pavos (*Bordetella avium*).³⁸

Etiología

Clasificación

La bacteria *H. paragallinarum* pertenece a la familia Pasteurellaceae.³⁹ Aun cuando se reconoce que es independiente del factor X, se le considera especie bacteriana integrante del género *Haemophilus*.¹⁸ A partir de 1992 se ha informado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes del factor V a partir de aves con coriza infecciosa en Sudáfrica⁴⁰⁻⁴² y recientemente en México.⁴³ La identificación de estas cepas independientes de ambos factores de crecimiento ponen en duda la actual nomenclatura de este microorganismo. Sin embargo, la clasificación taxonómica actual permanece así: superreino, Procaryotae; reino, Eubacteria; división, Gracilicutes; clase, Protobacteria; familia, Pasteurellaceae; género, *Haemophilus* y especie, *H. paragallinarum*.³⁹

Hollander y Mannheim,⁴⁴ mediante la caracterización de quinonas respiratorias, y Piechulla *et al.*,⁴⁵ mediante estudios de caracterización genética y fenotípica, sugirieron que *H. paragallinarum* fuera asignado al género *Actinobacillus*. Aunque no se han

another genus, which could be allocated within the Pasteurellaceae family.⁴⁶

Morphology and dyeing

H. paragallinarum is a nonsporing, Gram negative bacterium. In agar plates, bacteria are pleomorphic and show rod or coccobacilli morphology with a tendency to form some filaments with short chains of bacteria. In broth cultures, bacteria are frequently observed as very pleomorphic rods and also faded bacteria that look like residues of the colorant agents. (Terzolo, non-published data). In direct smears from nasal mucus it is common to observe longer bacilli forms with metachromatic granules inside the bacterial cell which are observed by methylene blue dye.⁴⁷ The size of the bacterium is from 1 to 3 µm length and from 0.4 to 0.8 µm width.⁴⁸ Nowadays, *H. paragallinarum* is regarded as a non-motile bacterium. However, in a recent study based on biochemical and immunological tests and under particular culture conditions, its motility was demonstrated.⁴⁹

Growth requirements and culture medium

The reduced form of NAD (NADH) (1.56 to 25 µg/ml medium),⁵⁰ or its oxidized form (20 to 100 µg/ml),⁵¹ are necessary for the *in vitro* growth of *H. paragallinarum*. The exceptions are the NAD-independent isolates described in South Africa and Mexico.⁴⁰⁻⁴³ Furthermore, addition of 1%-1.5% sodium chloride (NaCl) is essential for culture growth.⁵⁰ Some strains show improved growth when 0.1%-0.5% of inactivated serum, from chicken or horse, are added to the medium.⁵² On agar plate cultures, NAD can be added or supplied by a feeder bacteria (*Staphylococcus* spp) cultured as a cross-streaked colony to *H. paragallinarum*.

Most strains of *H. paragallinarum* are grown under microaerobic or anaerobic conditions with increased levels of CO₂ (5%-10%).⁵³ Another adequate atmospheres are the ones produced by the traditional candle-jar method, or by adding 5%-10% CO₂, or the common *Campylobacter* genus atmospheres, generated by commercial kits or gaseous mixtures.² The incubation period onto 7%-10% bovine or sheep, defibrinated blood agar plates is 16-24 h at 37°C. For the cultivation of *H. paragallinarum* the following basic medium are used together with several supplements: brain-heart infusion, chicken-meat infusion, *Haemophilus* maintenance medium (HMM),⁴⁸ Casman agar,⁵³ gonococcal agar,⁵⁴ test medium (TMA)⁵⁵ or Columbia agar.⁴ Serum-free, modified Casman broth has been used for vaccine production.⁵⁶ Also, supplemented TMA with chicken

desarrollado estudios definitivos, es probable que pronto esta bacteria sea considerada miembro de otro género en la familia Pasteurellaceae.⁴⁶

Morfología y tinción

H. paragallinarum es una bacteria gramnegativa no esporulada. En cultivos en agar, es pleomórfica y presenta morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos. En cultivos en caldo, es frecuente observar formas muy pleomórficas e inclusive bacterias degradadas que aparecen como si fueran manchas de los colorantes empleados (Terzolo, datos no publicados). En frotis directos de mucus nasal es común observar formas bacilares más largas con presencia de gránulos metacromáticos en su interior, que se visualizan con azul de metileno.⁴⁷ El microorganismo mide de 1 a 3 µm de longitud por 0.4 a 0.8 µm.⁴⁸ A la fecha esta bacteria se considera inmóvil. Sin embargo, en un estudio reciente basado en pruebas bioquímicas e inmunológicas, se observó motilidad en *H. paragallinarum* bajo ciertas condiciones de cultivo.⁴⁹

Requerimientos de crecimiento y medios de cultivo

La forma reducida de NAD (NADH) (1.56 a 25 µg/ml de medio),⁵⁰ o la forma oxidada (20 a 100 µg/ml),⁵¹ son necesarias para el cultivo *in vitro* de *H. paragallinarum*. Las excepciones son los aislamientos independientes de NAD descritos en Sudáfrica y México.⁴⁰⁻⁴³ También el agregado de 1.0%-1.5% de cloruro de sodio (NaCl) es esencial.⁵⁰ Algunas cepas tienen mejor crecimiento cuando se agrega 0.1%-0.5% de suero inactivado de pollo o de caballo al medio de cultivo.⁵² El NAD puede ser adicionado a los medios de cultivo o aportado por una bacteria nodriza (*Staphylococcus* spp) cultivada como una estría alimentadora transversal al cultivo de *H. paragallinarum*.

La mayoría de las cepas de *H. paragallinarum* se desarrollan en condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, con incremento en la tensión de CO₂ (5%-10%) en la atmósfera.⁵³ También son adecuadas las atmósferas producidas con el tradicional método del frasco con vela o el agregado de 5%-10% de CO₂ y también las destinadas al crecimiento de las bacterias del género *Campylobacter*, que pueden generarse mediante el empleo de sobres comerciales o mezclas gaseosas.² El periodo de incubación en base de agar con 10% de sangre desfibrinada de bovino u ovino es de 16 a 24 h, luego de incubar a 37°C. Para el cultivo de *H. paragallinarum* se han empleado los siguientes medios con diversos suplementos: Infusión

serum and NADH is called TM/SN.⁵⁷

A very efficient alternative is the use of defibrinated haemolyzed horse blood, prepared by maintaining it during 40 minutes at 56°C into a water bath with periodic agitation.² Non-haemolyzed blood agar plates require the addition of NAD or a feeder strain culture. When the haemolyzed blood is added, NAD is released through erythrocyte lysis and therefore, addition of chemical NAD is not required. Furthermore, in this agar, colonies are more than twice bigger than the ones growing onto non-haemolyzed agar plates with cross-streaked feeder strain (Figure 1). It is recommended to use horse blood, because in this species the nutrients are very adequate and useful for fastidious microorganism cultures. A further advantage of the use of this haemolyzed blood is the possibility to freeze and store it for a long time. Combination of Columbia agar with 5% - 7% defibrinated horse blood plates, cultivated under microaerobic atmosphere, is an adequate medium and can be used as a selective medium when these antibiotics are added: bacitracin, 5 UI/ml; cloxacilin, 5 µg/ml and vancomycin, 20 µg/ml.^{2,4}

Combination of V- and X-factor discs onto TM/S agar (without NAD) could be used to test the requirements of both growth factors. However, the use of commercial discs could produce a high percentage of false-positive cultures, which misleadingly appear to be as dependent of both growth factors, X and V. As we have mentioned before, the species *H. gallinarum*, was incorrectly described as being dependent of the X-factor due to these false results. Hence, the commercial brand of the both, the discs and the media used have to be carefully controlled for selecting the most adequate product.⁵⁸ It is much more accurate to perform the porphyrin test to determine X-factor dependency.^{2,39} Furthermore, a *S. aureus* feeder strain onto haemolyzed blood agar plates may be used to demonstrate the satellite growth of NAD-dependent

cerebro-corazón, infusión de carne de pollo, medio de mantenimiento (HMM),⁴⁸ agar de Casman,⁵³ base de agar para gonococos,⁵⁴ agar medio de prueba (TMA)⁵⁵ o agar Columbia.⁴ El caldo de Casman modificado se utilizó libre de suero para la producción de bacterinas.⁵⁶ Asimismo, el TMA complementado con suero de pollo y NADH se conoce como TM/SN.⁵⁷

Otra opción muy conveniente es el uso de sangre equina hemolizada, que se prepara manteniéndola en baño María a 56°C durante 40 minutos con agitación periódica.² A diferencia de la sangre no hemolizada, que siempre requiere la adición de NAD, o bien el cultivo de una cepa nodriza, la hemólisis libera NAD de los eritrocitos y entonces se prescinde de su adición al medio. Además, en este agar las colonias adquieren más del doble de tamaño que en la sangre no hemolizada con la estría de la bacteria nodriza (Figura 1). Se recomienda el uso de la sangre equina, ya que en esta especie animal los nutrientes son muy adecuados y recomendables para el desarrollo de microorganismos muy exigentes. Otra de las ventajas es que esta sangre, una vez hemolizada, puede conservarse por tiempo prolongado en congelación. La combinación de la base de agar Columbia con 5%-7% de sangre equina hemolizada en atmósfera microaerofílica es un medio muy adecuado y puede usarse como medio selectivo cuando se le adicionan antibióticos como: Bacitracina, 5 UI/ml; cloxacilina, 5 µg/ml y vancomicina, 20 µg/ml.^{2,4}

La combinación de discos con el factor X de crecimiento en agar TM/S (sin NAD) puede ser empleada para probar el requerimiento de ambos factores. Sin embargo, el uso de discos comerciales puede producir un alto porcentaje de cultivos que falsamente pueden parecer dependientes de ambos factores, X y V. Como ya se mencionó, éste fue uno de los motivos por los cuales se describió erróneamente a la especie *H. gallinarum* como dependiente del

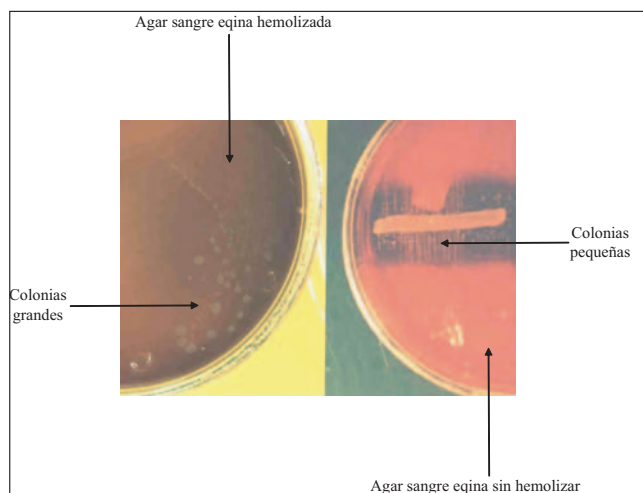


Figura 1. Comparación de dos cultivos en agar Columbia sin NAD al tercer día de incubación en atmósfera microaerofílica. Aislamiento regional (Argentina) de *Haemophilus paragallinarum*. A la izquierda: Con 7% de sangre equina hemolizada. Colonias grandes que no requieren la estría alimentadora de la cepa nodriza. A la derecha: Con 7% de sangre bovina sin hemolizar. Colonias muy pequeñas que sólo crecen en satelitismo de la estría alimentadora de la cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*). NAD-free Columbia agar plates, at the 3rd day of incubation under microaerobic atmosphere. Local isolate (Argentina) of *Haemophilus paragallinarum*. Left: 7% haemolyzed-horse blood plate. Bigger colonies do not require cross-streaking of feeder colony. Right: 7% non-haemolyzed bovine blood plate. Small colonies showed satellite growth near feeder colony (*Staphylococcus aureus*).

colonies; this is a very useful and non-expensive procedure that could be easily adopted by any laboratory.

Colony morphology and related features

After 24-48 h culture onto non-haemolyzed blood agar plates, V-factor-dependent isolates of *H. paragallinarum* produce tiny dewdrop colonies up to 0.3 mm diameter that only grow near to the feeder strain. Circular, convex, smooth, non-pigmented or non-haemolytic colonies are observed. *H. paragallinarum* colonies become smaller when they grow further away from the feeder colonies. For detection of obvious satellite growth, cultures have to be examined after 24 or 48 h of inoculation. NAD-independent *H. paragallinarum* isolates produce 1-2 mm colonies with no satellite growth.⁴⁸

When either Columbia or haemolyzed horse blood agar plates are used, colonies grow up to 3 to 5 mm of diameter after the same aforementioned incubation period. In this medium, isolated colonies are the biggest, becoming smaller when they growth near each other due to competition for the nutrients of the medium (Figure 1). Addition of the mentioned antibiotics to Columbia agar plates does not interfere or reduce the size of the colonies. Usage of either expired or dehydrate medium led to a reduction of the colony size.² It is interesting to highlight that in this agar, the culture of recently isolates from acute infectious coryza cases result in big mucoid colonies, while the culture of nonpathogenic strains, which usually have gone through many *in vitro* subcultures, produce much smaller colonies (Terzolo, non-published data).

Physiologic properties

H. paragallinarum shows a mesophilic, chemo-organotrophic metabolism and contents ubiquinone and dimethylmenaquinone as respiratory components. Furthermore, an increase of dimethylmenaquinone with an ubiquinone reduction tendency has been observed when it is cultivated with fumarate.⁴⁴

In *H. paragallinarum* bacterial transferrin receptors have been identified, an outer membrane proteins homologous with Tbp1 y Tbp2, recognized in other pathogen agents, that bind to specific ovotransferrin ends allowing free-iron utilization for bacterial growth.^{59,60}

Biochemical properties

H. paragallinarum could be biochemical differentiated from other Gram negative, potentially pathogenic

factor X. Por ello, tanto la marca comercial del disco como la del medio de cultivo a emplear, deben ser cuidadosamente controlados, para seleccionar el producto más adecuado.⁵⁸ Resulta mucho más seguro realizar la prueba de la porfirina para determinar la dependencia del factor X.^{2,39} En lugar de los discos, también puede usarse la estría nodriza de *S. aureus* en agar con sangre no hemolizada, para demostrar el crecimiento satelital de las colonias que presentan dependencia de NAD; éste es un procedimiento muy práctico y económico que está al alcance de cualquier laboratorio de bacteriología.

Morfología de las colonias y propiedades relacionadas

Después del cultivo en base de agar sangre sin hemolizar durante 24-48 h, los aislamientos de *H. paragallinarum* dependientes del factor V producen colonias pequeñas, en forma de gotas de rocío de 0.3 mm de diámetro, adyacentes a la colonia nodriza. Las colonias son circulares, convexas, de superficie lisa, no pigmentadas o hemolíticas. Las colonias se tornan más pequeñas a medida que se encuentran más alejadas de la colonia nodriza. Para que el crecimiento satelital sea obvio, los cultivos deben ser examinados de 24 a 48 h después de la inoculación. Los aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD, producen colonias de 1-2 mm que no muestran crecimiento satelital.⁴⁸

Cuando se emplea agar Columbia con sangre equina hemolizada, las colonias son mucho más grandes, alcanzan de 3 a 5 mm de diámetro en el mismo periodo de incubación. En este agar las colonias aisladas son las más grandes, mientras que se vuelven más pequeñas cuando crecen cercanas entre sí, ya que compiten por los nutrimentos del medio (Figura 1). La adición de los antibióticos antes mencionados al agar Columbia no interfiere con el crecimiento ni reduce el tamaño de las colonias. El empleo de medios de cultivo envejecidos o deshidratados conduce a una disminución del tamaño de las colonias.² Es interesante destacar que en este agar, el aislamiento primario de casos de coriza infecciosa aguda produce el aislamiento de colonias grandes y mucoides, mientras que el cultivo de cepas no patógenas, que generalmente han sufrido muchos subcultivos *in vitro*, produce el desarrollo de colonias mucho más pequeñas (Terzolo, datos no publicados).

Propiedades fisiológicas

H. paragallinarum tiene un metabolismo quimiorganotrófico mesofílico y contiene ubiquinona y dimetilmenaquinona como componentes en la cadena

bacilli for poultry (Table 1). Several methods for carbohydrate fermentation have been evaluated. However, the most repeatable results are obtained by means of using the plate method.⁶¹ Using these plates with phenol red, 92 *H. paragallinarum* isolates from several countries, and 40 isolates from Mexico were studied.^{62,63} In both studies, all the isolates produced acid from glucose and mannose, but do not from arabinose, cellobiose, dulcitol, galactose, inositol, lactose, melezitose, melibiose, raffinose, ramnose, ribose, trehalose and xilose. A variation in the acid production from manitol, maltose and sucrose was observed and five biochemical biovars were recognized. In Mexico, biovars I to IV have only been recognized.⁶³

The reduction of nitrates to nitrites, the fermentation of glucose without production of gas, oxidase negative activity, alkaline phosphatase presence, negative indol production, and negative urea or gelatin hydrolysis seem to be uniform features of *H. paragallinarum*.⁴⁸ This bacterium could be differentiated from other Gram negative bacteria from different genera by its incapability to produce formazan from 3,3,5-triphenyl-tetrazoil chlorhydrate (TTC).⁴ While this test is not widely used, its inclusion would be very advantageous for the identification of this bacterial species.

Antimicrobial susceptibility

Early studies of the antimicrobial susceptibility in *H. paragallinarum* have been mainly performed by the

respiratoria. Además, se mostró una tendencia en la reducción de ubiquinona en favor de la dismetilmenaquinona cuando se cultivó en presencia de fumarato.⁴⁴

En *H. paragallinarum* se han identificado receptores de transferrina bacterianos, proteínas de membrana externa homólogas a la Tbp1 y Tbp2 de otros agentes patógenos, que se unen a terminaciones específicas de la ovotransferrina, y permiten la utilización del hierro para su crecimiento.^{59,60}

Propiedades bioquímicas

Bioquímicamente, *H. paragallinarum* puede ser diferenciado de otros bacilos gram-negativos potencialmente patógenos para las aves (Cuadro 1). Se han evaluado varios métodos para detectar la fermentación de carbohidratos en *H. paragallinarum*. Sin embargo, mediante el método en placa se obtienen los resultados más repetibles.⁶¹ Usando el método en placa con rojo de fenol, se estudiaron 92 aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varias partes del mundo y 40 aislamientos de México.^{62,63} En ambos estudios, todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa, pero no de arabinosa, celobiosa, dulcitol, galactosa, inositol, lactosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, trehalosa y xilosa. Se observó variación en la producción de ácido a partir de manitol, maltosa y sucrosa, y se reconocieron cinco biovariantes bioquímicas. En México, únicamente se han reconocido las biovariantes I a IV.⁶³

La capacidad de reducir nitratos a nitritos, la

Cuadro 1

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE *Haemophilus paragallinarum* Y OTRAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS PATÓGENAS PARA LAS AVES
BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *Haemophilus paragallinarum* AND GRAM-NEGATIVE BACTERIAL PATHOGENS FOR POULTRY.

Reaction	Agent				
	<i>Haemophilus paragallinarum</i>	<i>Pasterella multocida</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Paterella gallinarum</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Nitrate reduction	+	+	-	+	-
Catalase	-	+	+	+	-
Oxidase	-	+	+	+	+
Urease	-	-	+	-	-
Indol	-	+	-	-	-
B-galactosidase	+	+/-	-	+/-	+
Lysine decarboxiyase	-	-	-	-	-
Ornitine decarbolylase	-	-	-	-	-

From Soriano *et.al.*¹⁰⁸

Kirby-Bauer method.^{55,64} Antimicrobial susceptibility of isolates from India were studied using this method.^{65,66} The microdilution broth technique has been also used for testing the antimicrobial susceptibility of this bacterium, which appears to be more precise and repeatable technique.⁶⁷ A total of 92 isolates from several countries were sensitive to ampicillin, erythromycin and penicillin and showed variable susceptibility to neomycin, streptomycin and tetracycline, allowing the recognition of five susceptible biovars.⁶² Similarly, in a study that included 40 isolates from Mexico,⁶³ five biovars described by Blackall *et al.*⁶² were all recognized. Recently, in a similar study that included 22 isolates from Mexico and nine reference strains of *H. paragallinarum*, it was found that 96.8% of the studied microorganisms were sensitive to enrofloxacin, and showed variable susceptibility to oxitetracycline, gentamycin, phosphomicin, amoxicillin and trimethoprim, among other antimicrobials.⁶⁸

Serotyping

Initially, by agglutination tests, Page¹⁴ identified three serovars in *H. paragallinarum* isolates, named as A, B and C. Kume *et al.*,⁶⁹ by means of inhibition-hemagglutination tests, identified seven hemagglutinins (HA-1 to HA-7) distributed into three serogroups (I, II and III). Previous studies have showed a relationship among the serovars identified by both methods.^{70,71} Based on these findings and the further identification of two hemagglutinins,⁷² Blackall *et al.*⁷³ combined both methods and modified the original nomenclature, recognizing nine serovars distributed into three serogroups as follows: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, and C-4. This is a more detailed characterization method that allows the future inclusion and identification of new serovars. However, some confusion regarding the usage of these serotyping methods and scheme nomenclature still subsists nowadays. Soriano *et al.*⁷⁴ proposed the use of the Blackall's scheme for the hemagglutinin classification of *H. paragallinarum*, in order to have a unified criteria for epizootiological studies and practices.

Based on the Page's scheme, serovars A, B and C have been reconized in Argentina,⁴ Brazil,⁷⁵ Egypt,²³ Spain,⁷⁶ United States of America,¹⁴ Philippines,⁷⁷ Indonesia,⁷⁸ Mexico⁶³ and South Africa;⁷⁹ serovars A and B in Germany⁸⁰ and China;^{81,82} serovars A and C in Japan,⁸³ Malaysia,⁸⁴ Australia⁸⁵ and India;⁸⁶ and only the serovar C in Taiwan.⁸⁷

Based on Blackall's scheme, the following serovars have been identified: A-1, B-1 and C-2 in United States of America,^{69,72} A-4, C-2 and C-4 in Australia,^{72,73} A-1,

fermentación de glucosa sin la producción de gas, y la actividad negativa de la oxidasa, así como la presencia de la enzima fosfatasa alcalina y la falla de producir indol o hidrolizar urea o gelatina, parecen ser características uniformes en *H. paragallinarum*.⁴⁸ Esta bacteria se puede diferenciar de la mayoría de las bacterias gramnegativas de otros géneros, por su incapacidad para producir formazán a partir del clorhidrato de 3,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC).⁴ Si bien esta característica todavía no tiene un uso difundido, es un método muy práctico, por lo que es recomendable incluirla en el diagnóstico de esta especie bacteriana.

Susceptibilidad a antimicrobianos

Los estudios iniciales de la susceptibilidad antimicrobiana de *H. paragallinarum* se han realizado mediante el método de Kirby-Bauer.^{55,64} Empleado este método se estudió la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de India.^{65,66} También se ha empleado la técnica de microdilución en caldo en el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de esta bacteria, que parece ser más precisa y repetible.⁶⁷ Un total de 92 aislamientos procedentes de varias partes del mundo, fueron sensibles a la ampicilina, eritromicina y penicilina, y mostraron susceptibilidad variable a la neomicina, estreptomycin y tetraciclina, lo cual permitió el reconocimiento de cinco biovars de susceptibilidad en los aislamientos estudiados.⁶² De forma similar, en un estudio que incluyó 40 aislamientos de México⁶³ se identificaron las cinco biovariantes de susceptibilidad descritas por Blackall *et al.*⁶² Recientemente, en un estudio similar que incluyó 22 aislamientos de México y nueve cepas de referencia de *H. paragallinarum*, 96.8% de los microorganismos estudiados fueron sensibles a la enrofloxacin, y mostraron susceptibilidad variable a la oxitetraciclina, gentamicina, fosfomicina, amoxicilina y trimetoprima, entre otros antimicrobianos.⁶⁸

Serotipificación

Inicialmente, mediante pruebas de aglutinación en placa, Page¹⁴ identificó tres serovariedades en aislamientos de *H. paragallinarum*, designadas como A, B y C. Posteriormente, Kume *et al.*,⁶⁹ mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, identificaron siete hemoagglutininas (HA-1 a HA-7) distribuidas en tres serogrupos (I, II y III). Estudios previos mostraron una relación entre las serovariedades identificadas mediante ambos métodos.^{70,71} Con base en lo anterior y en la identificación de dos hemoagglutininas adicionales,⁷² Blackall *et al.*⁷³ combinaron estos métodos y modificaron la nomenclatura para

B-1, C-2 and C-3 in South Africa,^{69,72} A-1 and C-1 in Japan,^{69,72} A-3 in Brazil,⁶⁹ C-3 in Zimbabwe,⁸⁸ and A-1, A-2, B-1 and C-2 in Germany^{69,72} and Mexico.³⁷ Here, distribution of Kume serovars is as follows: A-1, A-2, B-1 and C-2 in Jalisco, A-1 and A-2 in the state of Mexico, B-1 and C-2 in Puebla, A-2 in Michoacan, C-2 in Morelos and B-1 in Sonora and Yucatan.³⁷

Antigenic structure

Hinz⁸⁰ described a heat-labile type-specific antigen and a heat-stable common antigen for strains of the serovars A and B. Sawata *et al.*⁸⁹ identified two, serovar-specific, heat-labile, trypsin-sensitive antigens designated L1 and L2. They also, identified three common antigens between the two serovars: L3, heat-labile and trypsin-sensitive; HL, heat-labile and trypsin-resistant; and HS, heat-stable and trypsin-resistant. Several studies on *H. paragallinarum* showed correlation between agglutinating serovar and immunotype specificity.⁹⁰⁻⁹²

Kato *et al.*⁹³ were the first to describe hemagglutinating activity in *H. paragallinarum* isolates. The pathogenicity and immunogenicity of these strains, are both directly correlated with the hemagglutinating ability of this bacterium.¹⁸ Hence, the strains used for vaccine production have to hemagglutinate in order to confer good protection and it is also very important to use the hemagglutination test to classify vaccine strains. These antigens are essential for protection, and both serovar type and variant antigens have to be included in bacterin formulations. Although it is possible to isolate non-pathogenic field strains of *H. paragallinarum* from carrier non-diseased chickens or to find spontaneously laboratory mutated strains, all of them lack protective activity because they do not induce hemagglutinating antibodies and, therefore, these strains could not be used as attenuated live vaccines.

The pathogenic strains of serovars A, B and C have antigenic determinants with hemagglutinating activity for erythrocytes from several animal species, even if they are phylogenetically distant.⁹⁴ While all bacterial suspensions of serovar A strains agglutinate at once fresh erythrocytes from several animal species, some bacterial suspensions of serovars B and C have to be previously treated, either chemically, physically, or in both ways, to elicit hemagglutinating activity.⁹⁵⁻⁹⁷ Moreover, non-hemagglutinating bacterial suspensions inactivated with thimerosal, kept during seven to ten days under refrigeration, may elicit hemagglutinating activity as bacteria become old (Terzolo, non-published data). These strains that after treatment or cold aging acquire hemagglutinating ability have actually masked these hemagglutinating antigens by other superficial

reconocer nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos así: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4. Éste es un método de caracterización más detallado que permite la inclusión de serovariedades conforme se vayan identificando. Sin embargo, a la fecha existe confusión en el empleo y nomenclatura de estos esquemas de serotipificación. Soriano *et al.*⁷⁴ han propuesto la utilización del esquema de Blackall para la clasificación serológica de hemoaglutininas de *H. paragallinarum*, que permite un criterio unificado para estudios y prácticas epizootiológicas.

En el esquema de Page se han reconocido las serovariedades A, B y C en Argentina,⁴ Brasil,⁷⁵ Egipto,²³ España,⁷⁶ Estados Unidos de América,¹⁴ Filipinas,⁷⁷ Indonesia,⁷⁸ México⁶³ y Sudáfrica.⁷⁹ Las serovariedades A y B en Alemania⁸⁰ y China.^{81,82} Las serovariedades A y C en Japón,⁸³ Malasia,⁸⁴ Australia⁸⁵ e India,⁸⁶ y únicamente la serovariedad C en Taiwán.⁸⁷

Con base en el esquema de Blackall, se han identificado las serovariedades A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América,^{69,72} A-4, C-2 y C-4 en Australia,^{72,73} A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica,^{69,72} A-1 y C-1 en Japón,^{69,72} A-3 en Brasil,⁶⁹ C-3 en Zimbabwe⁸⁸ y A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania^{69,72} y México.³⁷ Aquí la distribución de las serovariedades de Kume es la siguiente: A-1, A-2, B-1 y C-2 en Jalisco, A-1 y A-2 en el Estado de México, B-1 y C-2 en Puebla, A-2 en Michoacán, C-2 en Morelos y B-1 en Sonora y Yucatán.³⁷

Estructura antigénica

Hinz⁸⁰ describió un antígeno termolábil de tipo específico y un antígeno termoestable de tipo común en cepas de las serovariedades A y B. Sawata *et al.*⁸⁹ identificaron dos antígenos de tipo específico, termolábiles y sensibles a la tripsina, designados como L1 y L2. Asimismo, identificaron tres antígenos comunes para las dos serovariedades: L3, termolábil y sensible a la tripsina; HL, termolábil y resistente a la tripsina; y HS, termoestable y resistente a la tripsina. Otros estudios han mostrado correlación entre la especificidad de las serovariedades aglutinantes y la inmunovariedad de *H. paragallinarum*.⁹⁰⁻⁹²

Kato *et al.*⁹³ describieron por primera vez la capacidad hemoaglutinante en aislamientos de *H. paragallinarum*. La patogenicidad e inmunogenicidad de las cepas están directamente correlacionadas con la capacidad hemoaglutinante.¹⁸ Es por ello que las cepas usadas en las bacterinas deben hemoaglutinar para ser protectoras y es muy importante usar la prueba de hemoaglutinación para clasificar a las cepas vacunales, puesto que estos antígenos son cruciales en la protección, y sus tipos y variantes deben estar

antigens or capsules, such as hyaluronic acid, which after maceration discloses the hidden hemagglutinins. Nevertheless, in other cases, strains of serovars B or C are able to produce direct hemagglutination without any previous treatment, as reported by Soriano⁵² and Eaves *et al.*,⁷² who observed hemagglutinating activity in bacterial strains from the three serovars.

Two types of hemagglutinins (HA) were identified in the 221 strain of *H. paragallinarum*. Type 1 HA had biological and immunological properties similar to serovar-specific agglutination antigen L1. Type 2 HA had similar characteristics to the serovar-common agglutination antigen HL.^{98,99} Subsequently, it was determined that type 1 HA was a serovar A-specific antigen and type 2 HA was a serovar-common antigen, which comprises the three serovars.¹⁰⁰ Similarly, Sawata *et al.*¹⁰¹ described three HA antigens located onto the outer membrane of serovar A strains. These antigens were named as HA-L1, HA-HL, and HA-HS because their biologic and immunological properties were similar to the agglutination antigens L, HL, and HS respectively. Antigens HA-L1 and HA-HL were found to correspond to type 1 and 2 HA discovered by Yamaguchi and Iritani.⁹⁸ In the same way as the agglutination antigen L1, the HA-L1 antigen induced serovar-specific protective immunity in vaccinated chickens.^{92,102}

Iritani *et al.*¹⁰³ extracted a heat-labile polysaccharide antigen from a serovar 2 strain that had similar properties to the serovar C-specific antigen L2. In contrast to type 1 HA of serovar A, this C antigen failed to display hemagglutination activity. Also, these investigators extracted a lypopolysaccharide antigen able to inhibit the hemagglutination of *H. paragallinarum* type 1 HA.¹⁰⁴ Similarly, Bragg *et al.*,¹⁰⁵ by means of a monoclonal antibody panel, showed that both lypopolisaccharide and protein antigens, are important antigenic structures.

Cellular characterization

Mouahid *et al.*¹⁰⁶ characterized the whole cell carbohydrates, fatty acids, and phospholipids composition of *H. paragallinarum*. The main carbohydrates identified were ribose, glucose, galactose and glucosamine, glucoheptose, while a small number of strains also showed 2-keto-3-deoxyoctonate and n-glycolic neuraminic acid. Tetradecanoic acid (14:0), a mono-unsaturated hexanoic acid (16:1 cis) and n-hexadecanoate (16:0), represented 90% of the total fatty acids identified. The main phospholipids were identified as phosphatidyl-ethanolamine (80%), lysophosphatidyl-ethanolamine (10%) and phosphatidyl-glycerine (10%).

Blackall *et al.*¹⁰⁷ characterized the outer membrane

muy bien representados en la formulación antigénica que se emplee para las bacterinas. Si bien es posible aislar cepas de campo de *H. paragallinarum* totalmente apatógenas de aves portadoras que no tienen enfermedad, o encontrar mutantes espontáneas en el laboratorio, todas ellas carecen de poder protector por no inducir la producción de anticuerpos hemoaglutinantes y, por tanto, tampoco podrían ser usadas como vacunas atenuadas.

Las cepas patógenas de las serovariedades A, B y C poseen determinantes antigénicos con capacidad hemoaglutinante de eritrocitos de varias especies animales, aun distantes filogenéticamente.⁹⁴ Sin embargo, suspensiones bacterianas de la serovariedad A hemoaglutinan eritrocitos frescos de varios animales, mientras que tanto eritrocitos como la suspensión bacteriana de cepas de las serovariedades B y C deben ser tratadas por medios físicos o químicos, o ambos, para expresar actividad hemoaglutinante.⁹⁵⁻⁹⁷ También es posible realizar suspensiones con las cepas que no hemoaglutinan, inactivarlas con timerosal y conservarlas de siete a diez días en refrigeración, para comprobar luego que por envejecimiento algunas de ellas se pueden tornar hemoaglutinantes (Terzolo, datos no publicados). Estas cepas que luego del tratamiento o del envejecimiento adquieren capacidad hemoaglutinante, en realidad han tenido estos antígenos ocultos por otros más superficiales o capsulares, como el ácido hialurónico, que al macerarse exterioriza a las hemoagglutininas. En otros casos, cepas de la serovariedad B o C aglutinan sin tratamiento alguno, como lo informaron Soriano⁵² y Eaves *et al.*,⁷² quienes detectaron actividad hemoaglutinante en cepas de las tres serovariedades.

Dos tipos de hemoagglutininas (HA) se han identificado en la cepa 221 (A-1) de *H. paragallinarum*. La HA tipo 1 presentó propiedades biológicas e inmunológicas similares al antígeno aglutinante L1 específico de serovariedad. La HA tipo 2 presentó características similares al antígeno aglutinante HL, común entre serovariedades.^{98,99} Posteriormente se determinó que la HA tipo 1 era específica de la serovariedad A, y que la HA tipo 2 era un antígeno formado por las tres serovariedades.¹⁰⁰ De forma similar, Sawata *et al.*¹⁰¹ describieron tres tipos de HA localizados en la membrana externa de cepas pertenecientes a la serovariedad A. Los antígenos fueron nombrados como HA-L1, HA-HL y HA-HS debido a que sus propiedades biológicas e inmunológicas fueron similares a las observadas en los antígenos aglutinantes L, HL y HS, respectivamente. Se encontró que los antígenos HA-L1 y HA-HL correspondían a las HA tipos 1 y 2 descubiertas por Yamaguchi e Iritani.⁹⁸ De forma similar al antígeno aglutinante L1, el antígeno HA-L1 indujo

proteínas (OMP) of reference 0083 (serovar A-1), 0222 (B-1) and Modesto (C-2) strains, and also included the Australian HP31 (C-2) isolate. The main OMP were identified and named from A to H. Weight range was estimated from 26500 kDa (G) up to 87000 kDa (A). OMP H (31 500 kDa) was only identified in HP31 isolate.

Conclusion

H. paragallinarum bacterium has phenotypic characteristics that allow it to be identified and differentiated from other bacterial pathogens of chickens. Based on NAD requirements and related properties, is likely that the taxonomic classification of this microorganism will change. However, both NAD dependent and independent isolates of this Gram negative bacterium, only reported in South Africa and Mexico, are regarded as the etiologic agents of infectious coryza. Furthermore, hemagglutinins of *H. paragallinarum* are recognized as the main antigenic structures. Nine serovars distributed into three serogroups in the Blackall's scheme are currently recognized. The role of these bacterial structures in pathogenesis and immunogenicity, as well as prevention and control of infectious coryza will be discussed in a future review paper for this journal.

Referencias

1. Blackall PJ, Matsumoto M. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry, Ames: Iowa State Press, 2003:691-703.
2. Terzolo HR. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Rev Med Vet 2000; 81:262-269.
3. Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clin Microbiol Rev 1999; 12:627-632.
4. Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993; 37:310-314.
5. Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Pathol 1997; 26:365-376.
6. De Blicke L. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl (coryza infectious *gallinarum*). Vet J 1932; 88:9-13.
7. Elliot CP, Lewis MR. A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. J Am Vet Med Assoc 1934; 84:878-888.
8. Delaplane JP, Erwin LE, Stuart HO. A hemophilic bacillus as the cause of an infectious rhinitis (coryza) of fowls. Bull Agric Exp Stn RI Coll 1934; 244:1-12.

inmunidad específica de serovariedad en pollos inmunizados.^{92,102}

Iritani *et al.*¹⁰³ extrajeron un antígeno polisacárido, termolábil, a partir de una cepa de la serovariedad 2, que presentó propiedades similares al antígeno L2 específico de la serovariedad C. De forma inversa a la HA tipo 1 de la serovariedad A, este antígeno no mostró actividad hemoaglutinante. Asimismo, extrajeron un antígeno lipopolisacárido capaz de inhibir la hemoaglutinación de la HA tipo 1 de *H. paragallinarum*.¹⁰⁴ De forma similar, Bragg *et al.*¹⁰⁵ mediante un panel de tres anticuerpos monoclonales, mostraron que los antígenos de tipo lipopolisacárido y proteínico son estructuras antigénicas importantes.

Caracterización celular

Mouahid *et al.*¹⁰⁶ caracterizaron la composición de carbohidratos, ácidos grasos y fosfolípidos de *H. paragallinarum*. Los principales carbohidratos identificados fueron ribosa, glucosa, galactosa y glucosamina, glucoheptosa, mientras que un número menor de cepas exhibieron también 2-keto-3-desoxioctano y n-ácido glicolilneuramínico. El ácido tetradecanoico (14:0), un ácido hexanoico monoinsaturado (16:1 cis) y n-hexadecanoato (16:0), representaron 90% de los ácidos grasos totales identificados. Los principales fosfolípidos identificados fueron fosfatidil-etanolamina (80%), lisofosfatidil-etanolamina (10%) y fosfatidil-glicerina (10%).

Blackall *et al.*¹⁰⁷ caracterizaron las proteínas de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés, *outer membrane protein*) de las cepas de referencia 0083 (serovariedad A-1), 0222 (B-1) y Modesto (C-2), incluyendo el aislamiento australiano HP31 (C-2). Las principales OMP fueron designadas de A a H. El rango de pesos estimado fue de 26 500 (G) hasta 87 000 kDa (A). La OMP H (31 500 kDa) estuvo presente únicamente en el aislamiento HP31.

Conclusion

La bacteria *H. paragallinarum* posee características fenotípicas que permiten identificarla y diferenciarla de otras bacterias patógenas para los pollos. Con base en los requerimientos de NAD y otras propiedades relacionadas, es probable que la clasificación taxonómica de este microorganismo cambie en un futuro. Sin embargo, aislamientos de esta bacteria gramnegativa, tanto dependientes como independientes de este factor de crecimiento, identificados únicamente en Sudáfrica y México, son considerados agentes etiológicos de la coriza infecciosa. Asimismo, las hemoaglutininas de *H. paragallinarum* son reconocidas como las estructuras antigénicas principales. A la

9. Nelson JB. Studies on an uncomplicated coryza of the domestic fowl. I. The isolation of a bacillus which produces a nasal discharge. J Exp Med 1933; 58:689-692.
 10. Schalm OW, Beach JR. The etiology of a respiratory disease of chickens. Science 1934; 79:416-417.
 11. Schalm OW, Beach JR. Cultural requirements of the fowl-coryza bacillus. J Bacteriol 1936; 31:161-169.
 12. Delaplane JP, Erwin LE, Stuart HO. The effect of the X-factor, of sodium chloride, and of the composition of the nutrient media upon the growth of the fowl coryza bacillus, *Haemophilus gallinarum*. J Agric Res 1938; 56:919-926.
 13. McGaughey CA. Organisms of the *B. influenzae* group in fowls. J Comp Pathol 1932; 45:58-66.
 14. Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res 1962; 23:85-95.
 15. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J Med Microbiol 1969; 2:75-78.
 16. Malkinson M, Machany S, Aronovici A, Davidov K, Weisman Y. Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. Vet Rec 1987; 120:461-462.
 17. Blackall PJ. The avian haemofili. Clin Microbiol Rev 1989; 2:270-277.
 18. Blackall PJ, Yamamoto R. *Haemophilus gallinarum* - a re-examination. J Gen Microbiol 1989; 135:469-474.
 19. Linzitto OR, Abeiro HD, Benítez R, Menéndez NA. Estudios bacteriológicos y clínicos de coriza infecciosa. Rev Med Vet 1988; 69:98-101.
 20. Arzey GG. The effects of infectious coryza on the egg production of a layer flock. Aust Vet J 1987; 64:124-126.
 21. Giurov B. Clinical cases of infectious coryza and properties of isolated *Haemophilus* strains. Vet Med Nauki 1984; 21:22-30.
 22. Kerr E, Hammarlund MA. Coryza - plain or complicated. Proceedings of 31st Western Poultry Disease Conference & 16th Poultry Health Symposium; 1982 February 24 -March 3; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1982:5-6.
 23. Aly M. Characteristics and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* isolates from upper Egypt. Assiut Vet Med J 2000; 43:319-338.
 24. Roberts DH, Hanson BS, Timms L. Observations in the incidence and significance of *Haemophilus gallinarum* in outbreaks of respiratory disease among poultry in Great Britain. Vet Res 1964; 76:1512-1516.
 25. Matzer N. Summary of studies of infectious coryza in Guatemala. Proceedings of 23rd Western Poultry Disease Conference & 8th Poultry Health Symposium; 1974 March 19-21; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1974:48-49.
 26. Sobti DK, Dhaneswar NS, Chaturvedi VK, Mehra KN. Isolation and characterization of *Haemophilus paragallinarum* and morphoculturally related organisms from cases of infectious coryza in Mahakaushal belt. Indian Vet J 2001; 78:987-989.
- fecha, la clasificación serológica de estos antígenos en el esquema de Blackall, reconoce nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos. El papel de estas estructuras en la patogenia e inmunogenicidad de esta bacteria, así como la prevención y control de la coriza infecciosa serán discutidos en otro trabajo de revisión en esta revista.
-
27. Takagi M, Takahashi T, Hirayama N, Mariana S, Ohta S. Survey on infectious coryza of chickens in Indonesia. J Vet Med Sci 1991; 53:637-642.
 28. Rashid RA, Poieiecha JZ. Epidemiological study of an outbreak of infectious coryza on a poultry farm in Iraq. Avian Dis 1984; 28:235-237.
 29. Baumann P. Presence and incidence of *Haemophilus paragallinarum* in Swiss poultry stocks. Schweiz Arch Tierheilkd 1982; 124:189-201.
 30. Rooney WF. Infectious coryza - the disease and current control measurements in California. Proceedings of 28th Western Poultry Disease Conference and 13th Poultry Health Symposium; 1979 March 19-22; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1979:11-14.
 31. Cutler GJ. Living with infectious coryza. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 April 22-25; Acapulco (Guerrero) México. California (Davis): University of California, 1980:79-80.
 32. Droual R, Bickford AA, Charlton BC, Cooper GL. Outbreak of infectious coryza in Northern California. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 March 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:12.
 33. Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channig SE. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. Avian Dis 1990; 34:1009-1016.
 34. Hoerr FJ, Putnam M, Rowe-Rosmanith S, Cowart W, Martin J. Case report: infectious coryza in broiler chickens in Alabama. Proceedings of 43rd Western Poultry Disease Conference; 1994 February 27 - March 1; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1994:62-63.
 35. Matsumoto M. Persistence of *Haemophilus paragallinarum*: field observations and laboratory findings. Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference; 1999 April 24-27; Vancouver (British Columbia) Canada. California (Davis): University of California, 1999:81-82.
 36. Guzman LM, Fabela RM, Garrido CM. Experiences with bacterins in the control of infectious coryza in Sonora. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 April 22-25; Acapulco (Guerrero) Mexico. California (Davis): University of California, 1980:76-78.
 37. Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez GI, García-

- Delgado GA, Fernández RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis* 2001; 45:680-683.
38. Black A. Bacterial and parasitic diseases of New Zealand poultry. *Surveillance* 1997; 24:3-5.
 39. Kilian M, Biberstein EL. *Haemophilus*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:568-569.
 40. Horner FR, Bishop GC, Haw C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. *Avian Pathol* 1992; 21:421-427.
 41. Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. *Avian Pathol* 1995; 24:453-463.
 42. Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol* 1992; 31:363-368.
 43. García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. *Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference*; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.
 44. Hollander R, Mannheim W. Characterization of haemophilic and related bacteria by their respiratory quinones and cytochromes. *Int J Syst Bacteriol* 1975; 25:102-107.
 45. Piechulla K, Hinz KH, Mannheim W. Genetic and phenotypic comparison of three new avian *Haemophilus*-like taxa and of *Haemophilus paragallinarum* Biberstein and White 1969 with other members of the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981. *Avian Dis* 1985; 29:601-612.
 46. Blackall PJ. Haemophili at Thermophylae? A review of the avian haemophili. *Proceedings of 37th Western Poultry Disease Conference*; 1988 February 29- March 2; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1988:161-162.
 47. Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WH, Yoder HW Jr, editors. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991:186-195.
 48. Blackall PJ, Yamamoto R. Infectious coryza. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. Kenneth Square: American Association of Avian Pathologists, 1998:29-34.
 49. Negrete-Abascal E, Vaca S, Garcia-Gonzalez OP, Tavares F, Andrade A, Garcia RM, et al. Isolation of a putative *fliC* sequence in *Haemophilus paragallinarum* and *Pasteurella multocida*. *Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference*; 2002 May 5-10; Banff (Alberta) Canada. Canada (Guelph): International Pasteurellaceae Society, 2002:37.
 50. Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. *J Gen Microbiol* 1977; 98:349-354.
 51. Sato S, Shifrine M. Application of the agar gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis* 1965; 9:591-598.
 52. Soriano VE. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* bajo un esquema de hemoagglutininas (tesis de maestría). México (D.F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
 53. Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of atmospheric conditions on the growth of *Haemophilus gallinarum* in a defined medium. *J Gen Microbiol* 1976; 92:405-409.
 54. Sueishi T, Hayashi Y, Iritani Y. Use of gonococcal agar medium for preparation of antigen of *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. *Avian Dis* 1982; 26:186-190.
 55. Rimler RB. Studies of the pathogenic avian haemophili. *Avian Dis* 1979; 24:1006-1018.
 56. Rimler RB, Shotts EB, Davis RB. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. *Avian Dis* 1975; 19:318-322.
 57. Reid GG, Blackall PJ. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Dis* 1987; 31:59-63.
 58. Blackall PJ, Farrah JG. An evaluation of commercial discs for the determination of the growth factor requirements of avian haemophili. *Vet Microbiol* 1985; 10:125-131.
 59. Alcantara J, Schyvers AB. Transferrin binding protein two interacts with both the N-lobe and C-lobe of ovotransferrin. *Microbiol Pathol* 1996; 20:73-85.
 60. Ogunnariwo J A, Schryvers AB. Correlation between the ability of *Haemophilus paragallinarum* to acquire ovotransferrin-bound iron and the expression of ovotransferrin-specific receptors. *Avian Dis* 1992; 36:655-663.
 61. Blackall PJ. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus* species. *J Microbiol Methods* 1983; 1:275-280.
 62. Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drugs resistance patterns. *Avian Dis* 1989; 33:491-496.
 63. Fernandez RP, Garcia-Delgado GA, Ochoa P, Soriano VE. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. *Avian Pathol* 2000; 29:473-476.
 64. Reece RL, Coloe PJ. The resistance to antimicrobial agents of bacterial isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. *Aust Vet J* 1985; 62:379-381.
 65. Prabhakar TG, Dorairajan N, Swaminathan R, Sivakumar S. Antibiotic sensitivity pattern of *Haemophilus* species from infectious coryza in Namakkal. *Indian J Anim Sci* 1998; 68:888-889.
 66. Prasad V, Murthy KK, Murthy PR. Antibiotic sensitivity

- studies on *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens. Indian Vet J 1999; 76:253-254.
67. Blackall PJ. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1988; 32:742-747.
 68. Soriano VE, Velásquez QE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP. Susceptibilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum* a varios antimicrobianos. Memorias XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2001 octubre 9-12; Ciudad de Guatemala (Guatemala) Guatemala. Guatemala (Ciudad de Guatemala): Asociación Nacional de Avicultores, AC, 2001:524-528.
 69. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
 70. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:757-760.
 71. Sawata A, Kume K, Nakase Y. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:1901-1904.
 72. Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. J Clin Microbiol 1989; 27:1510-1513.
 73. Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J Clin Microbiol 1990; 28:1185-1187.
 74. Soriano VE, Tellez G, Fernandez RP. Proposal of the Blackall scheme for hemagglutinin serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Poult Sci 2002; 80(Suppl. 1):86.
 75. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. Avian Dis 1994; 38:269-274.
 76. Pagés MA, Costa QLL. Eficacia de una oleovacuna inactivada polivalente contra el coriza aviar. Med Vet 1986; 3:27-36.
 77. Nagaoka K, De Mayo A, Takagi M, Ohta S. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated in the Philippines. J Vet Med Sci 1994; 1017-1019.
 78. Poernomo S, Sutarma, Rafiee M, Blackall PJ. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. Aust Vet J 2000; 78:759-762.
 79. Blackall PJ, Eaves LE. Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust Vet J 1988; 65:362-363.
 80. Hinz KH. Differentiation of *Haemophilus* strains isolated from chickens. II. Serologic studies on the plate agglutination test. Avian Pathol 1973; 2:211-229.
 81. Chen X, Zhang P, Blackall PJ, Feng W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from China. Avian Dis 1993; 37:574-576.
 82. Zhang PJ, Miao M, Sun H, Gong Y, Blackall PJ. Infectious coryza due to *Haemophilus paragallinarum* serovar B in China. Aust Vet J 2003; 81:96-97.
 83. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Haemophilus infection in chickens. I. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. Jpn J Vet Sci 1978; 40:65-73.
 84. Zaini BT, Zai M, Iritani Y. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolated in Malaysia. J Vet Med Sci 1992; 54:363-365.
 85. Thornton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust Vet J 1984; 61:251-253.
 86. Tongaonkar S, Deshmunkh SG, Blackall PJ. Characterization of Indian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Proceedings of XXVII Convención Annual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 May 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:58-59.
 87. Lin JA, Shyu C, Yamaguchi T, Takagi M. Characterization and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serotype C in local chickens to Taiwan. J Vet Med Sci 1995; 58:1007-1009.
 88. Bragg RR. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: a further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Onderstepoort J Vet Res 2002; 69:129-132.
 89. Sawata A, Kume K, Nakase Y. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1979; 40:1450-1453.
 90. Kume K, Sawata A, Nakase Y. *Haemophilus* infection in chickens. 3. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 strains of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1980; 42:673-680.
 91. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Relationship between protective activity and antigenic structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. Am J Vet Res 1980; 41:97-100.
 92. Kume K, Sawata A, Nakai T. Serologic and immunologic studies on the three types of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. Jpn J Vet Sci 1983; 45:783-792.
 93. Kato K, Tsubahara H, Okuma S. Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1965; 27:457.
 94. Iritani Y, Miyajima M. Difference of chicken red blood cells in susceptibility to *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. Jpn J Vet Sci 1979; 41:401-403.
 95. Iritani Y. Separation with trypsin of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1979; 41:60-71.
 96. Iritani Y, Hidaka S. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus paragallinarum* by trypsin. Avian Dis 1976; 20:614-616.
 97. Iritani Y, Katagiri K, Tsuji K. Slide-agglutination test of *Haemophilus paragallinarum* antigen treated by trypsin to inhibit spontaneous agglutination. Avian Dis 1978; 22:793-797.

98. Yamaguchi T, Iritani Y. Occurrence of two hemagglutinins on *Haemophilus paragallinarum* strain 221 and comparison on their properties. Jpn J Vet Sci 1980; 42:709-711.
99. Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Serological and immunological differences between two hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* strain 221. Jpn J Vet Sci 1980; 42:713-715.
100. Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T, Sueshi T. Determination of types 1 and 2 hemagglutinins in serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1981; 25:479-483.
101. Sawata A, Kume K, Nakai T. Hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. Jpn J Vet Sci 1984; 46:21-29.
102. Kume K, Sawata A. Immunologic properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. Jpn J Vet Sci 1984; 46:49-56.
103. Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Biological activities of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of *Haemophilus gallinarum* in chickens. Avian Dis 1981; 25:29-37.
104. Iritani Y, Yamaguchi T, Katagiri K, Arita H. Hemagglutination inhibition of *Haemophilus paragallinarum* type 1 hemagglutinin by lipopolysaccharide. Am J Vet Res 1981; 42:689-690.
105. Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigen of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. Onderstepoort J Vet Res 1997; 64:57-63.
106. Mouahid M, Hinz KH, Engelgard E, Mutters R, Mannheim W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* by analysis of whole cell carbohydrates, fatty acids and phospholipids. Avian Pathol 1992; 21:127-136.
107. Blackall PJ, Rogers DG, Yamamoto R. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1990; 34:871-877.
108. Soriano VE, Fernandez RP, Tellez G. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. Vet Méx 2000; 31:245-253.